

明 細 書

イネのトランスポゾン遺伝子

5 技術分野

この発明は、イネのトランスポゾン遺伝子に関し、より詳細には、イネの *Ac/Ds* 型トランスポゾン遺伝子及びその自律性因子に関する。

従来技術

- 10 トランスポゾンは、転移の様式により RNA 中間体を介して転移するクラス I 因子と、DNA 分子のままで切り出され転移するクラス II 因子に大別される。イネではクラス I 因子である *Tos17* を用いた大規模な遺伝子タギングシステムが展開されているが、*Tos17* の転移にはカルス培養を経由するため高頻度で体細胞変異が同時に出ることが知られている (Trend. Plant Sci. 6: 127-134 (2001))。一方、クラス II 因子としては、MITE 型の *mPing* が報告されている (15 Nature, vol.421, No.6919, pp.167-170 (Jan. 2003))。

発明が解決しようとする課題

- しかし、*mPing* の転移には体細胞変異や高頻度の突然変異の誘発が引き起こされる蒔培養やγ線照射が必要とされる (Nature, vol.421, No.6919, pp.167-170 (Jan. 2003))。更にこれらトランスポゾンの標的配列の特異性などから、一部の変異しか得られないと考えられており、それ故、新たなタギングシステムが求められている。

25 課題を解決するための手段

本発明者らは、易変性で葉緑素の蓄積が低下する *pyl* (*pale-yellow leaf*) 変異の原因遺伝子を同定し、この変異に *Ac/Ds* 型に分類される新規トランスポゾンが関与することを見いだした。この結果は、イネにおいて通常の栽培条件下で初めて転移活性をもつ *Ac/Ds* 型トランスポゾン *nDart* (nonautonomous *Ds*

-related active rice transposon) を確認したものである。更に、この *Ac/Ds* 型トランスポゾン解析することにより、その自律性因子 *Dart* を見出した。

即ち、発明は、以下の (1) 又は (2) のいずれかの DNA から成るイネのトランスポゾン遺伝子 (*nDart*) である。

(1) 配列番号 1 で表される塩基配列から成る DNA

(2) (1) の塩基配列と相同性が 98% 以上の塩基配列から成り、該 DNA を有するイネを薬剤で処理することにより転移する DNA

更に、本発明は、以下の (3) 又は (4) のいずれかの DNA から成るイネのトランスポゾン遺伝子 (*Dart*) である。

(3) 配列番号 6 ~ 8 のいずれかで表される塩基配列から成る DNA

(4) (3) の塩基配列と相同性が 98% 以上の塩基配列から成り、該 DNA を有するイネを薬剤で処理することにより転移する DNA

トランスポゾンは細胞分裂が活発になる条件下の生育により、転移頻度が上昇することが知られている。そのため通常の生育条件で転移する *nDart* 及び *Dart* の転移頻度をさらに上昇させるためには、植物をストレス環境下で生育させることが有効である。このストレス環境とは、DNA の脱メチル化を引き起こす薬剤 5-アザシチジン処理、紫外線・γ線などの各種放射線の照射、又は植物細胞を脱分化させたカルス培養等の人工培養系の利用などである。上記処理により *nDart* 及び *Dart* の転移頻度を上昇させ、突然変異体の出現率を上げることによって効率的に望む変異体を得ることが可能である。

本発明は、また、上記に記載のいずれかのトランスポゾン遺伝子を含有するプラスミドである。ここで用いることのできるプラスミドとして、Ti プラスミド、pBI-121 プラスミド等のバイナリーベクターが挙げられる。ここで用いることのできるプロモーターとしては、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター、熱ショックプロモーター、化学物質誘導性プロモーター等が挙げられる。またプロモーター及び上記遺伝子の結合方法に特に制限は無く、通常の遺伝子工学的手法に従って適宜行うことができる。

また、本発明は、上記のいずれかのトランスポゾン遺伝子が導入された形質転

換体である。この宿主は植物であることが好ましく、宿主としては、シロイヌナズナ、タバコ、トマト、ペチュニア、アブラナ、ワタ又はトウモロコシが好ましい。このような植物を形質転換するには、通常の遺伝子工学的手法を用いて、この遺伝子を上記プラスミドに挿入し、この植物を形質転換することができる。

- 5 更に、本発明は、上記のいずれかの方法により、前記トランスポゾン遺伝子が転移して形質転換した植物又はその種である。この植物としてシロイヌナズナ、タバコ、トマト、ペチュニア、アブラナ、ワタ又はトウモロコシが好ましい。

図面の簡単な説明

- 10 第1図は、易変性 *pyl-v* 変異体を示す。
第2図は、表現型が安定となった *pyl-stb* (左図) と野生型の“台中 65 号”(右図) を示す。改変 white 培地に播種後 7 日目の個体を示す。
第3図は、*ply* 遺伝子マップベースクローニングを示す。
第4図は、実施例 1 の PCR 産物の電気泳動を示す。
- 15 第5図は、*ply* 変異体の *OsClpP* 遺伝子を示す。黒い四角はエキソンを示し、*atg* は開始コドンを示す。
第6図は、*ply-stb* 変異体の *OsClpP* 遺伝子の転写開始点周辺領域を示す。小文字はタンパク質へ翻訳される領域を示し、下線の *atg* は開始コドンを示す。最上の矢印は野生型の転写開始点を示し、その他の矢印は *ply-stb* 変異体の転写開始点を示す。肩の数字はクローニングした数を示す。
- 20 第7図は、復帰突然変異体の *OsClpP* 遺伝子構造 (A) と残されたフットプリント (B) を示す。下線の *atg* は開始コドンを示す。
第8図は、BLAST 法で検索した自立性因子を示す。
第9図は、インド型イネ (カサラス) と台中 65 号 (T-65) *pyl-v* 変異体との交雑種 (B3F1) の変異部分の電気泳動を示す。(1) は nDart1-0 (第3染色体)、(2) は nDart1-4 (3-1) (第3染色体)、(3) は nDart1-12 (第1染色体)、(4) は nDart200-2 (第1 2 染色体) の変異を示す。Line 1 はカサラス、Line 2 は T-65 *pyl-v*、Line 3-21 は交雑種 (B3F1) を示す。

発明の実施の形態

nDart と相同性の高いトランスポゾンの検索を BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) で行った。検索を行ったデータベースサイトは、米国立バイオテクノロジー情報センター及び国立遺伝学研究所 DNA データバンクであり、*nDart* (配列番号 1) を Query とした。また、遺伝子予測プログラムは、RiceGAAS システムを使用した (Yu.J, Hu.S, (2002) Science 296:79-92) 。BLAST による解析結果を表 1 に示す。31 個のイネ塩基配列が相同性を示し、7 つは *nDart* と 98% 以上の相同性を持っていた。

本発明において *nDart* の配列 (配列番号 1) が解明されたため、栽培品種改良に効率的な変異原として、交配により活性のある DNA トランスポゾンを用いた任意の系統に外来遺伝子を一切いれることなく持たせることができる。

nDart を転移させることによって、遺伝子が破壊された変異体を得ることができ、変異体の自殖後代より *nDart* が再転移しフットプリントによって変異が完全に安定化した変異体や野生型と同じ表現型に戻った復帰突然変異体を分離できる。*nDart* 配列中にプライマーを設計し、inverse PCR 法等により転移した *nDart* の再挿入により破壊された遺伝子を特定することができる。また、このような変異体とその遺伝子との相関を解明することにより、その遺伝子の機能を知ることができる。この場合上記の方法により、転移した *nDart* により破壊された遺伝子を特定することができる。

また従来の形質転換法によって他の植物に導入して転移させることにより、遺伝子が破壊された変異体を得ることができる。このような変異体とその遺伝子との相関を解明することにより、その遺伝子の機能を知ることができる。この場合、上記の方法により、転移したトランスポゾンにより破壊された遺伝子を特定することができる。

本発明の *nDart* 及び *Dart* 遺伝子の利用法として、これを変異原として利用し、イネや所望の植物等において、トランスポゾンでタグギングされた系統を作出することができる。特にイネにおいてタグギング系統を作出する場合は、交配によって容易に任意のイネ系統に *nDart* 及び活性な *Dart* 遺伝子を持たせることができる。このような系統は外来遺伝子を導入していないため、遺伝子組換え植物を

育成する場合に必要な物理的封じ込め設備を全く必要とせずに、従来の栽培方法を用いて屋外の圃場でタギング系統を大規模に展開することができる。このようにして得られた突然変異体は、遺伝学的解析方法や逆遺伝学的解析方法により解析することができる。この遺伝学的方法とは、変異体の表現型からその原因遺伝子

5 子を単離する方法であり、本トランスポゾンと変異体の表現型が連鎖していることを指標として、このタグ（トランスポゾン）を利用して、容易に原因遺伝子の同定と単離を行える。

また、逆遺伝学解析方法とは、遺伝子からその遺伝子の機能が失われた変異体を単離する方法である。多数の変異体より DNA を抽出し、プールを作る。そのプ

10ールを対象に PCR で選抜を行うことにより、目的の遺伝子にトランスポゾンが挿入した変異体を釣り上げることができる。

以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。

15

試験例 1

易変性の *pyl-v* 突然変異体は、日本型 H-126 とインド型 C-5052 の交雑 F2 で生じた 1 個体の斑入り葉緑素の蓄積が低下した変異体として、本発明者の一人である前川によって 1986 年に分離された（第 1 図）。*pyl-v* 系統は、淡黄色の

20 葉の中に野生型のイネと同じ濃緑色のセクターが細胞系列に沿った状態で出現することと、遺伝学的解析から易変性の原因は DNA 型トランスポゾンの挿入と脱離によると予想された。

試験例 2

25 次に、試験例 1 で得た *pyl-v* 変異体と日本型の“しおかり”又は“台中 6 5 号”との交配の繰り返しにより準同質系統を作出し、*pyl* 表現型が一見安定となった *pyl-stb* (pale-yellow leaf-stable) を分離した。

pyl-stb は交配により再び易変性を示す系統を分離することと薬剤処理により易変性を示す系統となることから、自律性因子の分離・不活化によって一過的に

安定となっている系統である。

土壌上で発芽した *pyl-stb* 変異体実生は、第 4 葉に至らずに枯死する。

本試験例では、*pyl-stb* 種子を寒天培地上で無菌的に第 4 葉まで培養し、そののち土に移植することによって高い確率で *pyl-stb* を結実に至らせた。改変 White 培地 (Kusumi K., Mizutani A. et al. (1997). Plant J. 12: 124 1-50) を用い、白色蛍光灯・連続光 $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 28°C の条件下で *pyl-stb* の種子を無菌的に播種し発芽させると第 4 葉以上に生育する。第 4 葉期まで生育させた *pyl-stb* は、土に移し替えることによって、高い確率で *pyl-stb* を結実させることができる。その様子を第 2 図に示す。

10

実施例 1

本実施例では、この *pyl-v* の斑入を引き起こす DNA 型トランスポゾン遺伝子と *pyl* 変異の原因遺伝子を同定することを目的としてマップベースクローニングを行った。

15 マップベースクローニングの解析には、試験例 1 で得た *pyl-v* 変異体を“しおかり”で戻し交雑して育成した準同質遺伝子型系統とインド型イネの“カサラス”を交雑して養成した F2 集団を用いた。この F2 の幼苗における *pyl-v* 変異体 21 個体から DNA を抽出して、12 染色体を網羅する 54 個のランドマーク SSR マーカー (Theor. Appl. Genet. 100: 697-712 (2000)) を用いて、*pyl* の簡易マッピングを行った。その結果、*pyl* 遺伝子は第 3 染色体の短腕の RM282 と RM251 の間 22cM 内にあることが判明した。

そこで、この 2 個のマーカー間に存在する日本晴の EST クローン (Plant Cell 14, 525-35 (2002)) を選抜した。これらの EST クローンの塩基配列を基に、これらの EST クローンを含むインド型 93-11 の一群の連結したゲノム DNA 25 配列であるコンティグ (Science 296: 79-92 (2002)) を選抜した。同時に、アメリカの CSHL グループが発表した日本晴の BAC クローンも選抜し、両者の塩基配列の比較から塩基配列に 8bp 以上の差のある部位を挟むようにして、PCR 産物で判別できるようなマーカーを 18 個作成した。これらのマーカーを用いて、F2 11800 個体の幼苗から *pyl* の遺伝形質を示す個体のみを選抜して、3112 個体に

ついて組み換え体を選抜した。その結果、約 80.4kb 内に *pyl* の候補遺伝子を絞り込むことができた。これらの関係を第 3 図に示す。

- この領域には 9 個の ORF が推定され、これらのすべての ORF についてゲノミックを増幅できるようにプライマーを設計し、“台中 65 号”、*pyl-stb* 及び “カサラス” についてその増幅産物を調べた。

- PCR の反応は 50 μ l の系で行ない、2.5U の LA Taq、1 \times GC buffer、400 μ M dATP、400 μ M dGTP、400 μ M dCTP、400 μ M dTTP (Takara 社)、0.2 μ M のプライマーセットに、100ng の “台中 65 号”、*pyl-stb* 及び “カサラス” のゲノミック DNA を加え滅菌 MilliQ 水 (ミリポア社) で液量を調整した。反応産物は、0.8% LOIII アガロースゲル (Takara 社) にて分画した。

その結果、プライマー Clp-3F (配列番号 2) と Clp-4R (配列番号 3) を用いて PCR を行なった場合に、*pyl-stb* と他の系統との間に約 600bp の違いが存在していることが判明した。その電気泳動図を第 4 図に示す。

- この Clp-3F と Clp-4R で増幅される遺伝子は、シロイヌナズナの *ClpP5* 遺伝子 (Trend. Plant Sci. 6: 127-134 (2001)) と 80% の相同性のある遺伝子 (*OsClpP*, 配列番号 9) であり、葉緑体に輸送されるタンパク質分解酵素であると考えられる。

実施例 2

- 本実施例では、実施例 1 で増幅された PCR 産物の差を確認するために、増幅産物の塩基配列を決定した。

- 実施例 1 の PCR 産物を QIA quick PCR purification Kit (キアゲン社) を用いて精製し、シークエンサー (ABI PRISM377, Applied Biosystem 社) にて塩基配列を決定し各種のソフトウェアを用いて塩基配列の解析を行った。その結果、607 bp の配列 (配列番号 1) が *OsClpP* 遺伝子のエキソン 1 に挿入されていることが判明した。その様子を第 5 図に示す。

この領域には DNA トランスポゾンの挿入時における 8bp の標的配列の重複 (TS: Target Site Duplication) を引き起こしており、607 bp の両末端には 19bp の逆向きの繰り返し配列 (TIR: Terminal Inverted Repeat) が存在

していた。

この挿入配列は、TSD が 8bp であることと TIR のこれまで報告されている DNA トランスポゾンとの類似から *Ac/Ds* 型に分類された。既知の *Ac/Ds* 型トランスポゾンとこの挿入配列 (*nDart*) の比較を表 2 に示す。この挿入配列は、自律性因子を持たない *Ds* に似た新規のトランスポゾン遺伝子である。

実施例 3

本実施例は、*pyl* 変異体において *nDart* (配列番号 1) が挿入された *OsClpP* タンパク質をコードしていると予想される遺伝子の転写開始点と遺伝子の全長を決定するために、mRNA の CAP 構造を認識する 5' RACE 法と 3' RACE 法を行った。

RNA はグアニジンチオシアン塩酸を用いて *pyl-stb* から抽出し、total RNA 1 μ g から THERMOSCRIPT (Invitrogen 社) を用いて cDNA を作成した。この cDNA 鋳型として GeneRacer Kit (Invitrogen 社) と *OsClpP* 遺伝子の塩基配列から作成したプライマー PG8-813R (配列番号 4) と Clp-3R (配列番号 5) で 2 度の PCR により転写開始点を決定した。その結果を第 6 図に示す。

pyl-stb ではタンパク質に翻訳される最初のアミノ酸となるメチオニンをコードする位置よりも下流に殆どの転写開始点があることが分かり、*pyl* 変異の原因が *OsClpP* 遺伝子にあると考えられた。

実施例 4

本実施例では、*pyl-v* 変異体から現れた独立した 15 系統由来の 49 個体の復帰突然変異体において *nDart* の脱離を調べるために、*OsClpP* 遺伝子の第 1 エキソンから第 7 エキソンを含んだ領域を増幅するプライマー Clp-3F (配列番号 3) と Clp-4R (配列番号 4) を用いて PCR を行った。

PCR の反応は 50 μ l の系で行ない、2.5 U の LA Taq、1 \times GC buffer、400 μ M dATP、400 μ M dGTP、400 μ M dCTP、400 μ M dTTP (Takara 社)、0.2 μ M のプライマーセットに、100ng の復帰突然変異体 Genomic DNA を加え滅菌 MilliQ 水 (ミリポア社) で液量を調整した。反応産物は、0.8% LOIII アガ

ロースゲル (Takara 社) にて分画し、配列番号 1 のトランスポゾン遺伝子のサイズが欠損した時と同じサイズの PCR 生産物が増幅されていることを確認した。

実施例 5

- 5 本実施例では、実施例 4 で増幅された PCR 産物が、*OsClpP* の第一イントロン領域からトランスポゾン遺伝子 (配列番号 1) が転移した結果であることを確認するために、増幅産物の塩基配列を決定した。

実施例 4 の PCR 産物を QIA quick PCR purification Kit (キアゲン社) を用いて精製し、シークエンサー (ABI PRISM377、Applied Biosystem 社)
10) にて塩基配列を決定し各種のソフトウェアを用いて塩基配列の解析を行った。その結果を第 7 図に示す。

復帰突然変異体では、2 種類のフットプリントによる塩基配列の変化以外は *OsClpP* 遺伝子エキソン 1 領域に変化は認められなかった。また、フットプリントによる変化も *OsClpP* の mRNA からタンパク質への翻訳には影響を与えず野生型
15 と同じ CLP タンパク質が復帰突然変異体では生産されていると考えられた。

実施例 6

本実施例では、試験例 2 で得た *pyl-stb* 種子をアザシチジン処理によって、*pyl-v* 変異体とすることが出来ることを調べた。

- 20 *pyl-stb* の種子を 0.15、0.3、0.45mM のアザシチジン水溶液に 24 時間、30℃で浸漬し、水洗した後発芽させ *pyl-v* の出現を確認した。その結果を表 3 に示す。アザシチジンの濃度を高くすることによって、*nDart* の転移の頻度を増加させることができることがわかる。

25 実施例 7

本実施例は、*nDart* の転移を制御している自律性因子トランスポゼースの検索を BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) で行った。

トランスポゼースを持っている配列は両端に *nDart* と同じ配列を持ち、その内部にトランスポース遺伝子を持っていると予想されるので、*nDart* (配列番号

1) の両端と同じ配列を有しているものを検索した結果、3つの配列が見出された(配列番号6~8)。これらを第8図に示す。

配列番号6は、これらのうち末端配列の相同性が最も高かった。配列番号6の両端各々183bpは、配列番号1の両端と98%以上の相同性をもっており、その内部のORFは、トランスポゼースを持っていることが遺伝子予測プログラムから示された。配列番号6は、キンギョソウで報告された*Tam3* トランスポゼースと相同性の高い自律性因子遺伝子であると考えられる。

配列番号6から予想される最も*Tam3*と相同性が高い自律性遺伝子を検索した。*Tam3*のトランスポゼースはイントロンを含まない構造であることが報告されており、上記31個の塩基配列からイントロンを含まないトランスポゼースを検索し、配列番号7を同定した。遺伝子予測プログラムによる解析から、配列番号7はイントロンを含まない構造を持っており、3末端にはDNA結合領域であるBED Zinc finger領域が存在していた。配列番号7は、*nDart*の転移を支配している自律性因子であると思われる。

配列番号7から予想されるトランスポゼースを指標にして、異なったスプライシングパターンを示す配列を検索し、配列番号8を同定した。第8図に示すように配列番号8は、相同性領域の1と3はもっているが相同性領域2はもっておらず、配列番号7とは異なった発現パターンと機能が予想される。

20 実施例8

本実施例では、インド型イネ(カサラス)に試験例2で得た台中65号(T-65)pyl-v変異体を交雑させ、カサラスに*nDart*及び自律性因子(*Dart*)を導入した。戻し交雑の回数は3回で理論的には93.8%がカサラスの遺伝子型に変換していると考えられる。

pyl変異体はOsClpP遺伝子に挿入していた*nDart1-Origin*(*nDart1-0*という。)が変異の原因となっていた。BLAST解析により日本型イネ(日本晴)には、*nDart1-0*と98%以上類似している*nDart*が少なくとも14個存在していることが分かった。*nDart1-0*への類似性の高さから番号を割り振り、*nDart1-1*から*nDart1-12*と命名した。そのうち2組の*nDart*(*nDart1-3*及

び nDart1-4) は全く同じ配列を持ちながらイネゲノム上の異なる位置に座乗していたことから、括弧内に染色体番号を示し区別した。

インド型イネ(カサラス)と台中65号(T-65)pyl-v 変異体との交雑種(B3F1)の変異部分をPCRで増幅した。プライマーとして、nDart1-0(第3染色体)には
5 配列番号10(F)及び11(R)、nDart1-4(3-1)(第3染色体)には配列番号12(F)及び13(R)、nDart1-12(第1染色体)には配列番号14(F)及び15(R)、nDart200-2(第12染色体)には配列番号16(F)及び17(R)に示すものを用いた。

第9図に、交雑種(B3F1、第9図 Line 3-21)の変異部分の電気泳動を示す。19個体中、9個体にnDart(配列番号1)が導入されていることがわかる(第9図(1))。同時に、カサラス型のバンドも出現していることから、戻し交雑した個体でもnDartの切り出しが行われている。このnDartは第3染色体に座乗するものであるが、他の染色体におけるカサラスの導入程度を調べてみると、第1、3及び12染色体のマーカは19個体全てがカサラス型
15 になっている(第9図(2)~(4))。以上から、nDart及び自律性因子(Dart)はインド型イネの中でもその活性を維持できることが結論できる。

さらに、インド型イネ(93-11)をアザシチジン処理をし、nDartの脱雌を確認した。通常成育条件下ではnDartの脱離は観察されないが、アザシチジン処理をおこなった93-11ではnDartの脱離が確認された。

表 1

Element	TSD	TIR(bp)	5' TIR (5'→3')	3'TIR (5'→3')	Size	TP	Reference
Ac	8	11	CAGGGATGAAA	TTTCATCCCTA	4565	+	Müller-Neumann et al. (1984)
As5145	8	11	CAGGGATGAAA	TTTCATCCCTc	4565	-3800	Xiao and Peterson (2002)
Ds1/rUq	8	11	CAGGGATGAAA	TTTCATCCCTA	401-406		Gerlach et al. (1987)
Ds(sh-m5933)	8	11	TAGGGATGAAA	TTTCATCCCTA	2040	+	Döring et al. (1984)
Tam3	8	12	TAAAGATGTGAA	TTTCATCTTTA	3629	+	Hehl et al. (1991)
nDart 配列番号1	8	19	TAGAGTGGCCAAACGGGC	GCCCCGTTTGGCCACCCTCTA	607	+	

表 2

表2 アザシチシン処理による易変性個体の出現

	正常個体	易変性個体	易変性及び異常な表現形を示した個体	計	発芽率 (%)	易変性個体 (%)
未処理個体	89	0	0	89	89	0.0
azaC 0.15mM	39	43	17	99	99	60.6
azaC 0.3mM	28	37	27	92	92	69.6
azaC 0.45mM	25	34	36	95	95	73.7

表 3

nDart family	塩基配列(bp)	染色 体	5' TIR 保 存性	3' TIR 保 存性	TSD bp	Similarity to nDart	nDartとの置換部位 (5' 末端からの距離)
			TAGAGGTGGC CAAACGGC	GCCCGTTTGG CCACCTCTA			39 67 83 109 173 333 413
nDart-d1	607	3	100%	100%	8	99.51%	C->T A->G C->T
nDart-d2	607	3	"	"	8	99.51%	G->A A->G
nDart-d3	607	3	"	"	8	99.51%	G->A A->G
nDart-d4	608	4	"	"	8	99.51%	G->A A->G
nDart-d5	601	3	"	"	8	98.85%	A->G
nDart-d6	597	1	"	"	8	98.02%	CGGCACGGCC A->G
nDart-I1	607	Indica	"	"	8	99.18%	A->G G->T

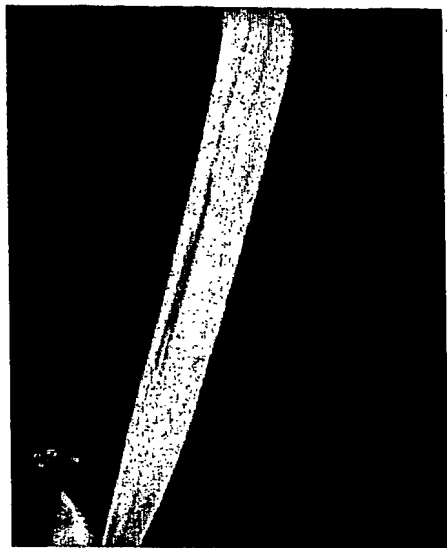
nDartとの置換部位									
	441	496	501	516	518	520	524		
nDart-d1									
nDart-d2								G->A	
nDart-d3								G->A	
nDart-d4			A+						
nDart-d5	CACGG-								
nDart-d6	G->A								
nDart-I1				C->A	T->C	A->G			

請 求 の 範 囲

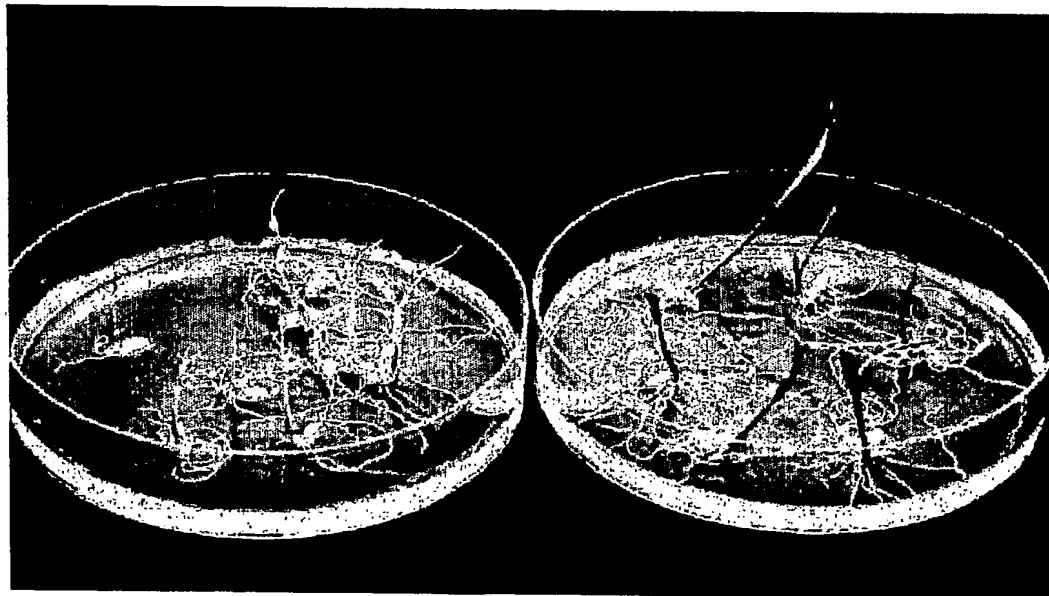
1. 以下の（１）又は（２）のいずれかのDNAから成るイネのトランスポゾン遺伝子。
- 5 （１）配列番号１で表される塩基配列から成るDNA
 （２）（１）の塩基配列と相同性が９８％以上の塩基配列から成り、該DNAを有するイネを薬剤で処理することにより転移するDNA
2. 以下の（３）又は（４）のいずれかのDNAから成るイネのトランスポゾン遺伝子。
- 10 （３）配列番号６～８のいずれかで表される塩基配列から成るDNA
 （４）（３）の塩基配列と相同性が９８％以上の塩基配列から成り、該DNAを有するイネを薬剤で処理することにより転移するDNA
3. 前記薬剤が５－アザシチジンである請求項１又は２に記載のトランスポゾン遺伝子。
- 15 4. 請求項１～３のいずれか一項に記載のトランスポゾン遺伝子を含有するプラスミド。
5. 請求項１～３のいずれか一項に記載のトランスポゾン遺伝子が導入された形質転換体。
6. 宿主が植物である請求項５に記載の形質転換体。
- 20 7. 宿主がシロイヌナズナ、タバコ、トマト、ペチュニア、アブラナ、ワタ又はトウモロコシである請求項６に記載の形質転換体。
8. 請求項５～７のいずれか一項に記載の形質転換体を薬剤で処理することにより請求項１又は２に記載のトランスポゾン遺伝子を転移させる方法。
9. 前記薬剤が５－アザシチジンである請求項７に記載の方法。
- 25 10. 請求項８又は９に記載の方法により、前記トランスポゾン遺伝子が転移して形質転換した植物又はその種。

1/8

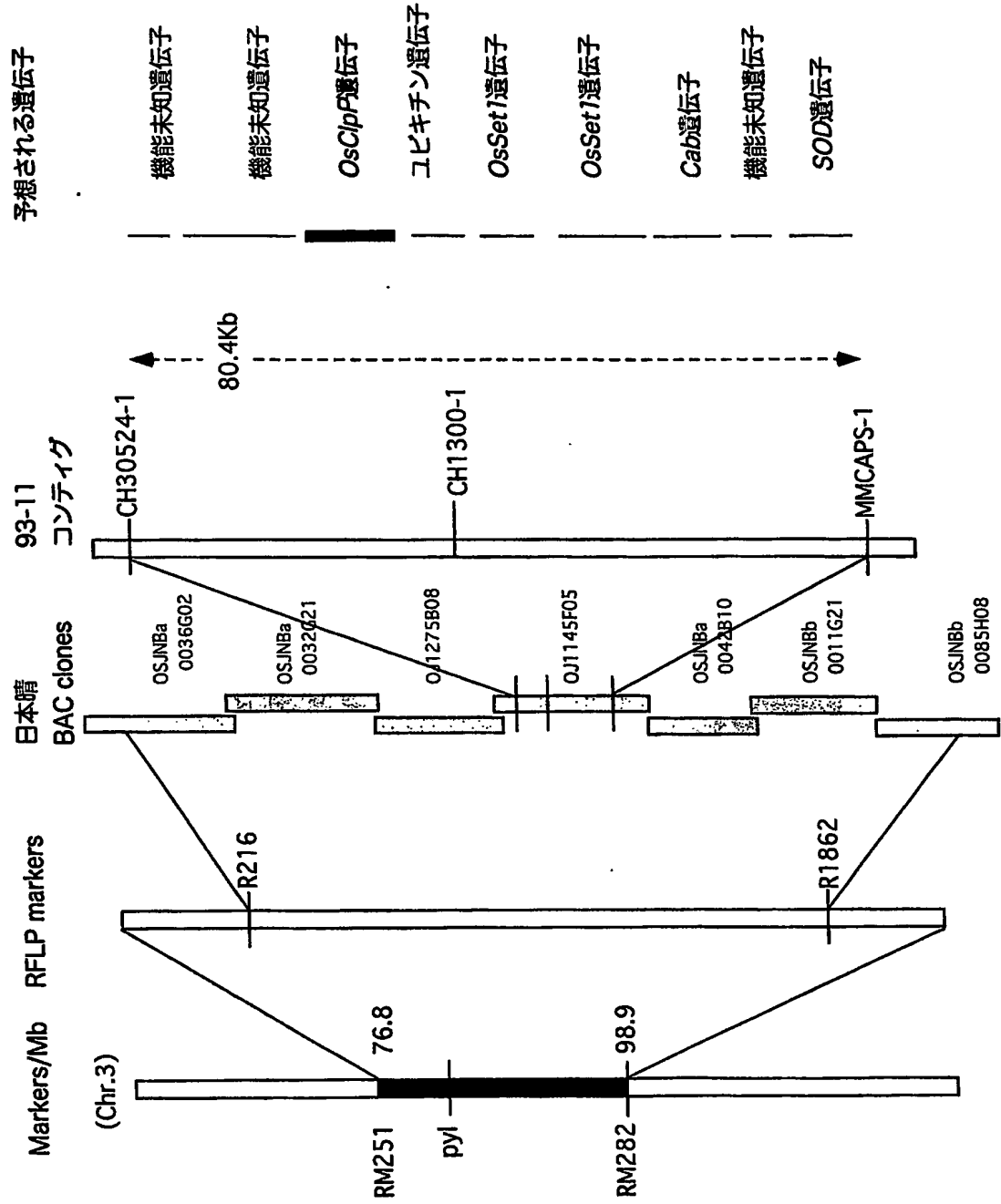
第 1 図



第 2 図

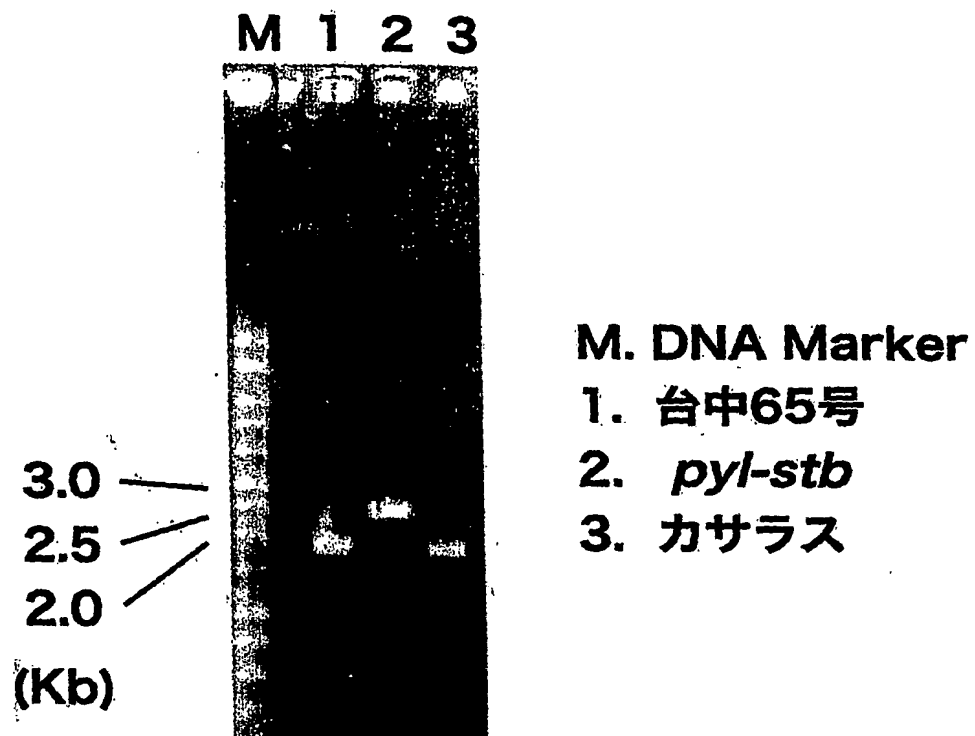


第 3 図

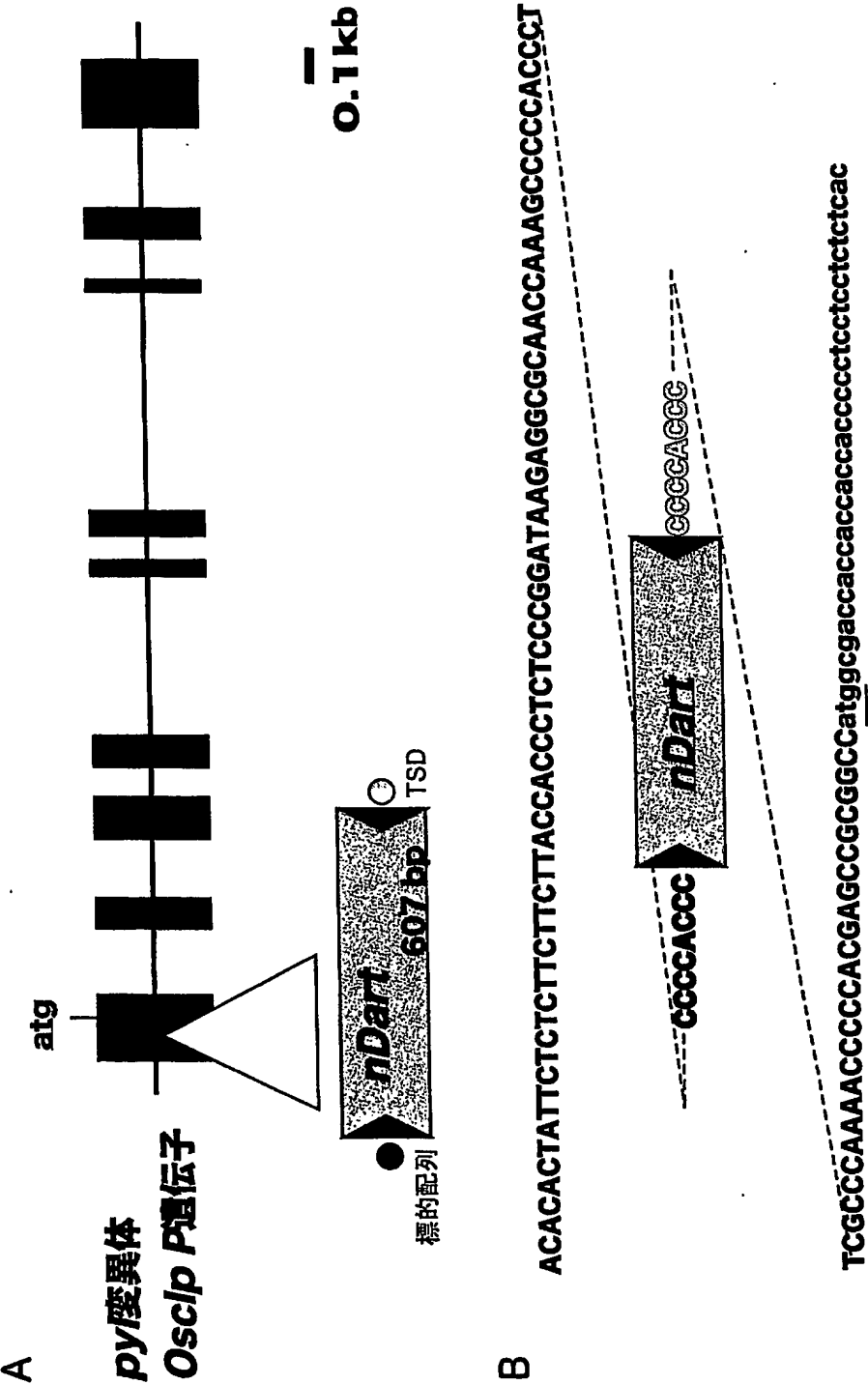


3/8

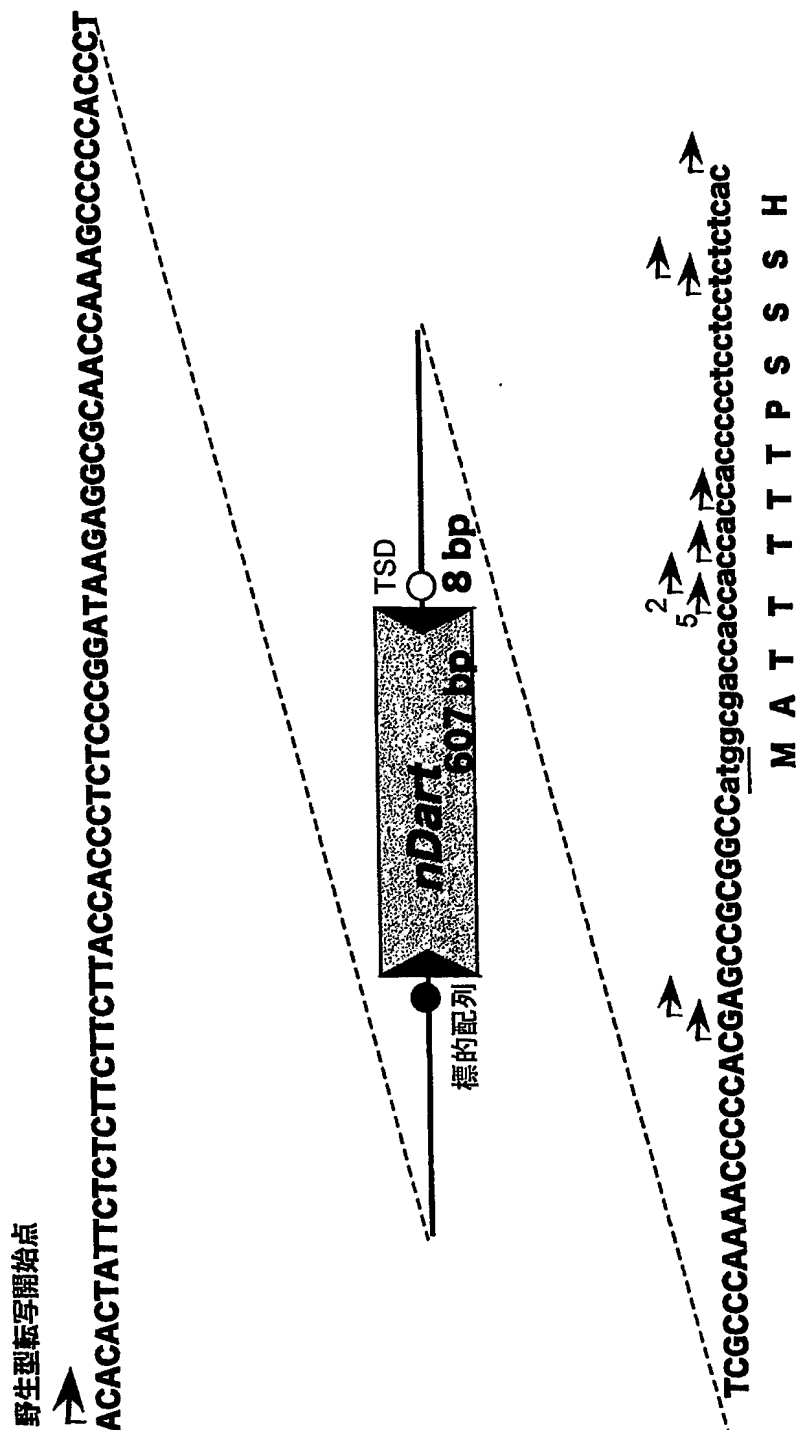
第 4 図



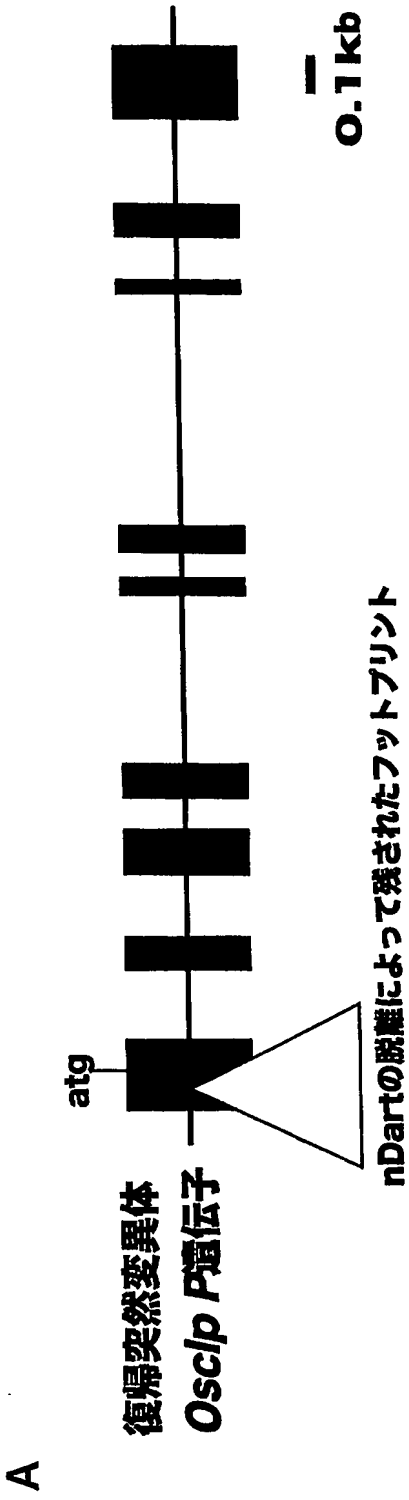
第 5 図



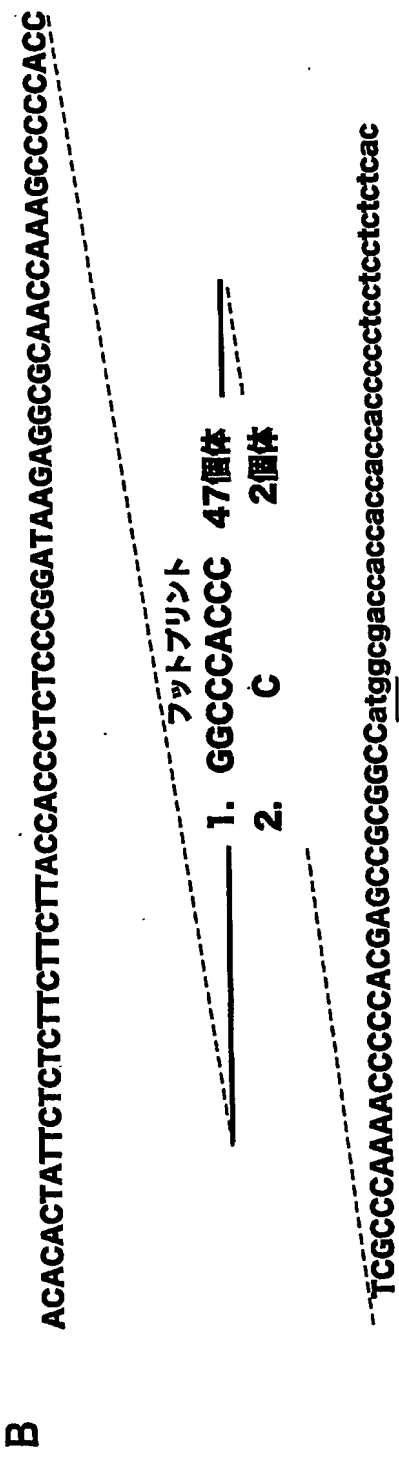
第 6 図



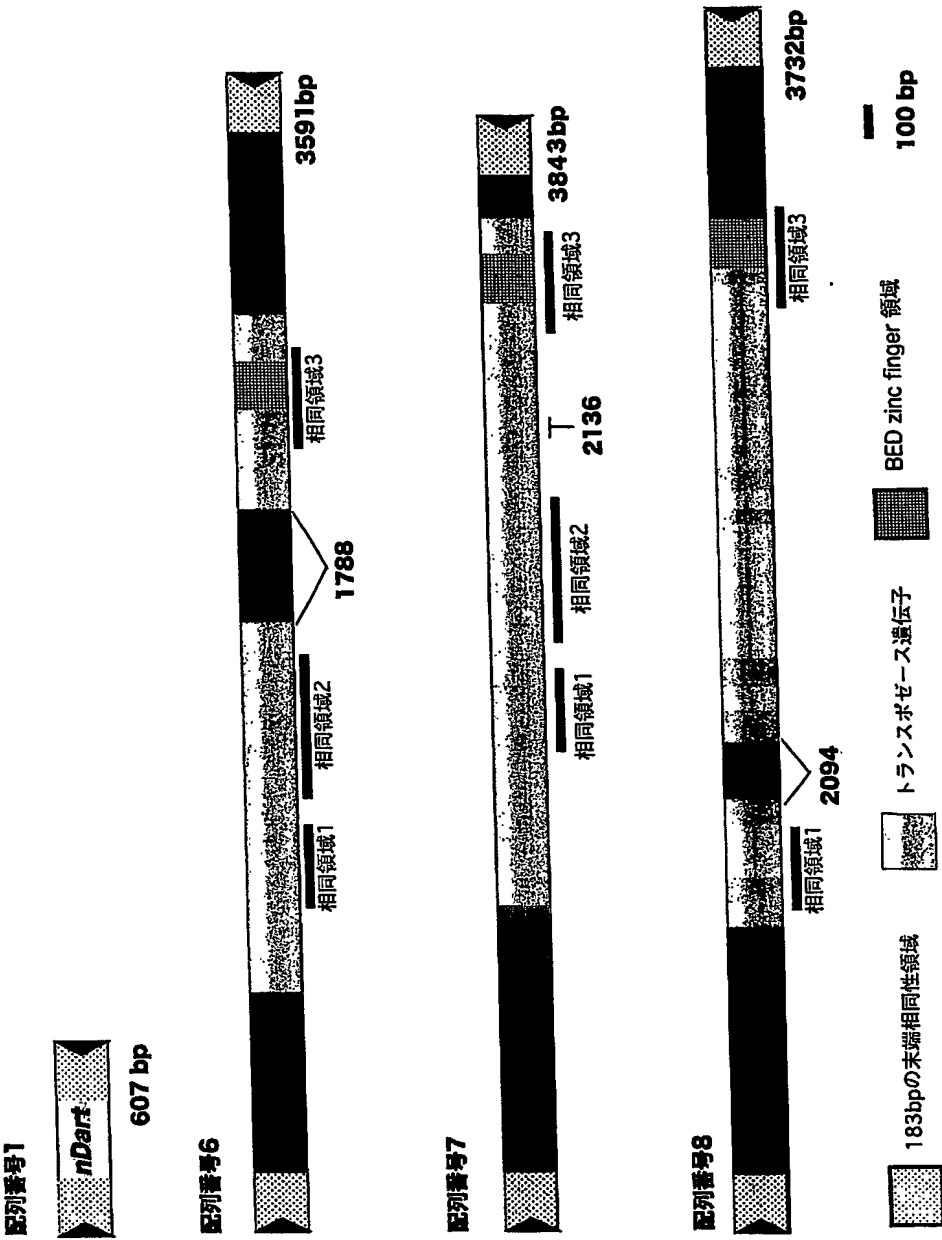
第 7 図



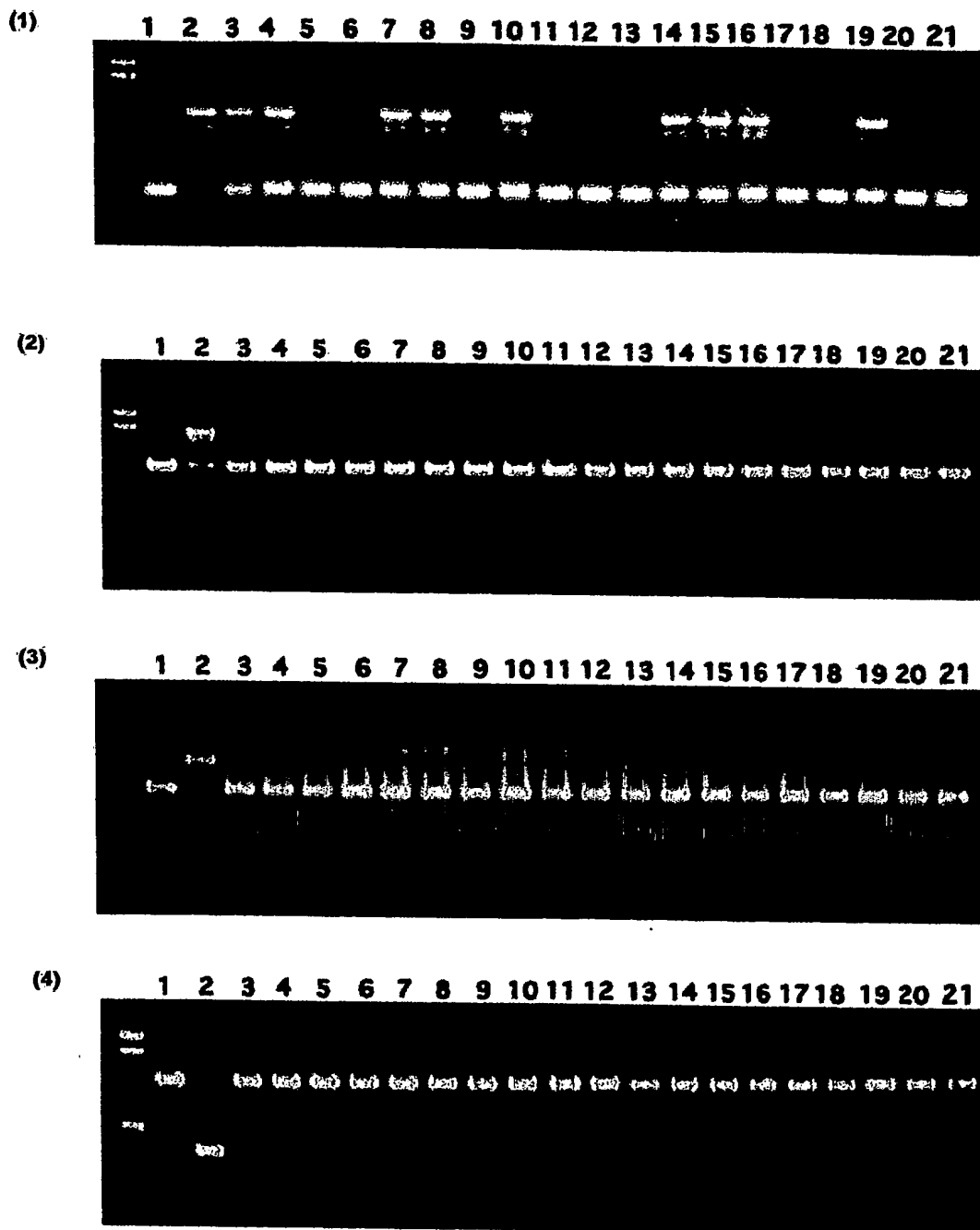
6/8



第 8 図



第 9 図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> イネのトランスポゾン遺伝子

<130> FS04-411PCT

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 607

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

tagaggtggc caaacgggcc gggccaaaac gggcggcccg aggcacggcg gaacctgtag	60
ccggcacggc ccggcacggc ctgctacagt aacgggccgt gccggcacgg cacgagtagc	120
cgtgccgtgc ttgggccgcc ggccgagccc gcggggccggc acggcacggc acagctactg	180
tagtaagtcc gcattctcatc ctccgcaag tccgtatctc atccctccca actgacggcc	240
cagcccgcta gccgcctccg caagtccgtt gagcacccct cctagctgat ggcccagccc	300
gccagccacc tccgcaagtc cgcattgcat cctccgcgc catttcggtt cctgggccaa	360
ccgtgccccg tccacggccc atttttcatt cacgggcccg tactgacacg gcgggccaca	420
cgcattgccgt gccggcacgg gcacggcccc gccatccacg gcccgctgctt gggccggcgg	480
ctcggcacgt gggtcgggac ggcacggccc gtttcatgag ccgtgcctaa cgggccgtgc	540
cgaaacgggc cgtgccggac ccgtgcccgt gccgtgccgg gccgggccgc ccgtttggcc	600
acctcta	607

<210> 2

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
taacgggtgt gtgtctggtg 20

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
gcaactgaaa cccttacttg aa 22

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
gcggttgaag ggctttaagg 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5

catcctccac ggggtccacca

20

<210> 6

<211> 3591

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 6

tagaggtggc caaatggggc gggccaaacg ggcggcccga ggcacggccg aacctgtagc 60

aggcacggcc cggcacggcc tgctacagta acgggcccgtg ccggcacggc acgagtagcc 120

gtgccgtgct tgggccgctg gccgagcccg cgggccggca cggcacggca cggctactgt 180

agcgggcccgg cacggcacgg cccgcggcac ggcacggcac ggcacgccgg cggcccgtca 240

ggcgcggaca gggcgggcgg cggtcgaatg ggaaggcgcc acgtggcact aacggctatt 300

tgaccgttca aatttgaaaa taaccgttgg gaggctaaaa aattcataaa aatttcgaaa 360

aaattccaaa aaatctcaaa tttcgcccta taaatagggc atgaaccca gccatttctc 420

ctcatccac actcctcatc ttgtgctctc aagtgtttta agtgcctctt ttgttctcaa 480

gtgtgcattt tttttgattt tgacaaaatt tgctcaaatt ttgtcaaaaa tcaaaattag 540

tttcgtagtt caacagtttg atgcagagg tttgaagagc tcgcagttgg aaagatgtaa 600

gtaatatcca aatttgtgta ttatttgiat tgtgtttgtg aattcaataa atattcgaaa 660

atttgtttat gtccgtttta attttcagaa tggatccgaa ctttcatac cagtcgccgt 720

cgttcacctt gggtgatttc gacccaact acatgtcggg gtttgatggg acctccgat 780

cggctccaac tccaccatct gtggaggagg taccggttca tacggctgtc gttgaggagg 840

taccggttca ggcggagaca gcttcggaag gatattccgg aaccgcgagc ggaagtgttt 900

cgacacacac cggctcgaag agatcgagaa cctccggtgt gtggcaaagc ttcgatgaga 960

taaaggaaac atgccccgac ggaagggagg tatcgaaagc ccgttgtaga atatgtaggc 1020
aaatattatc tgctcgttct tctgggtgta caggtcacct caagcgccat gcggagtcgt 1080
gtgccaagaa gcaaggaata caactccggc agcagcaact tatggtaaac ccagacggta 1140
cggtagacag ttgggagtag gatcccatgg ttgctcggga atctcttgtc cggttaatcg 1200
ccaggcaaga ttacccttg aactttgggg agtcccctgc tttgaacat tacattcagc 1260
aatctcataa cctaggttt aaagctgtga gtaggcaaac atcaactaga gatttagaga 1320
atgtttatca caaggaagca actgcactta aggaactgtt tagtacatgt actttctctg 1380
ttagtggtac ttcagatata tggagtagta gagctagaga ggattatctt agcgtagtgt 1440
ttcattttgt tgatgatgat tggcaattac aaaagagagt tttagggctt aggttaatag 1500
atgtctcaca tacaggagaa aacatagctg aaagaattag ggaagtaatt aatgaattta 1560
atcttgctga taaaatattt gctgtcacc tagataatgc atctgcta atctagggcta 1620
ttgaaatatt gcaaccttta ttttgtgtgt atgtcaatc ttttctact catcagcgtt 1680
gtgcatgtca tataattaat ttgattgtta agactggcat gaagagggtta ggtgaccaca 1740
tcgatgctgt tcgtcaagca atcgctgggt taactgcttc taaccgcgg attgctgcat 1800
ggaagagggt ttgcaatgcg gccggtgtga aagctcgtta gtttgccacc gatgcagagc 1860
atcgggtgaa tgcaacgtat ttaatgttaa aagttgtttt acctatagt agtttacttt 1920
ctgattttgt tcagtcacgt ggtggcccaa gaaacagtga cgggtcttca gtactgaacg 1980
agcatgtttg ggcaattgtc caaaaatttt accaatttct agaaactttt tatgattgta 2040
ctctaacttt gtcacaagtt tattatocaa ctgctaatat aattttgcac aaccttcttg 2100
aaattgttac tttatttaaa gaatacgaaa atgatgacgt tctaactgaa cctgtctttc 2160
acatgaaaca aaaatatttg aaatatigga aaaatatacc tatgttgtat gctcttgctt 2220

ttgttttaga tcctaggtgt aaattaaggg gattgtctgc tattttatca cttgttggag 2280
atactatagg ttagattat agttcttttt atactgaggt tagacgtaaa ttatatgagg 2340
tttttgaag atatgaagta aagtttcagg aagttcgcca gcagagaccc cctcctatcc 2400
ccactacagg taagaagaag atacagtggg gtaggatttg gggtaggatcg tcttcaagtt 2460
caatccaagg tggtagcagt tcgtcggcta caagtggaga cgcctcttcg catgttgttg 2520
ccgaagagtt gtccggttat ttggacagcg acgcatcca ccacgaagca caagatttca 2580
acgtcctcgg gtggtagaat gaccacaaga taacatatcc tgtgctttca aaactagcac 2640
gggatgtgtt gacggtgccc gtgtcgacgg tgtcctccga atcggccttc agtctatgcg 2700
gccgaatcat cgaagaccgg aggacgactc tgcgcagcga ccacgtcgaa atgctactaa 2760
gcgttaaaga ctgggagctt gctcgacaac atgccaata cactgaggac aaccaagaat 2820
tggctgcccc gttagagcaa ctctacctgg atccagacca accccagtag aattttgtta 2880
gaagtagttc tgaccttga gctgtactct tttcttgtc atggttttct cattttcccc 2940
tatgagtttt tacatgacaa agtttttaaa gaggcagcat gtatcattgt atcctgtaat 3000
gatataaaca tcaataaagg tcattactat ttttaacaaa ttcttttgca atattttcgc 3060
aagtgtggat ttatctttaa attatttcaa aataatgaat cacaatctat atttttaaat 3120
ttttcaacac aacaaaaaaa taccattttt tctttttttt aacattagca aatcattact 3180
ttttaaaaa acttttatit ccatttttta aataccattt tttcattttt taacattagt 3240
aatcattac ttttttttaa acattttatt tccattttta attttttttt tccttataca 3300
tttcctttgc ttttttttaa aaaaaaaca ctgtgcacta caggctggcg ggctggcggc 3360
ctgccttcac gggccgccgt gccccgaacg gcccgtaggc cgcggcgctg ccgtgccggc 3420
acgggcacgg ccgggccatc cacgggccgt gcttgggccg gcggctcggc acgtgggccg 3480

gcacggcacg gcccgtttca tcagccgtgc ctaacgggcc gtgccgaaac gggccgtgcc 3540

ggaaccgtgc ccgtgccggg ccgggccgtg ccgcccgttt ggacacctat a 3591

<210> 7

<211> 3843

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 7

tatacctggc caaatgggcc gtgccaagcc gggccggccc aagcacgacc gcactgtaga 60

aggcccaggc ccggcacggc acgccggcct gtgggccgtg ccggcacggc ccgtttaccc 120

gtccgtgtc tgggccgacg ccatagcccg tgggccagca cggcacggca cgtttactgt 180

agagggtgg cacggcccgg cacggcccgc gagcacggca cggcacggga tcggctcggc 240

cgcgcacacc gcggcaccgc gcacgtggcg ccaagcggcc gagccgccga gggcagccgc 300

ggggccaggc ggccgggaagc gcgcgtcgct tcgttcgcgc gtggcgcgtg gcaagcggcg 360

tcgcgacgtg tcggcgtgtc gctggggctg gccagctggg aggctgggac gctgcctcac 420

gctgggtcgg tcgtcactc gctctcgtg cctgtctgcc tgtctgccac tctgcctccg 480

tgctctgttg ggagcagccg agacagcgac tcggcgagac cccgtacggc ggccgaacgg 540

ctagtcaaac gacgaatgcg agagtccac gtgtcccca acggctagtg agctaattcca 600

acgaccagaa gtagccgttg gagagcaaaa aaaaaggaaa aaaattcgaa aaaaatatga 660

aatttatctt tataaatagg acaccacca gagcattctg aatcatccat acctccatt 720

ttgtgctctg ttgtgctctt tcgtgtgata gatcgatttt ttgatttaga caaaatttga 780

caaaattttg tgtaaaatca aaaatagttt gtgactaaaa atagtgcata caagaggtgt 840

aaagccaagc aaaggtggta agaaagaagt acgtcatata ttcagtttta tgtattattt 900

tattttatgt tatgcgaata aatattctga aatttgttta tgttgtttta aattttcaga 960

atggatgaat cgaacattcc atcggtcacg ttaggtgatt tcgaccctaa ctacgtgtcg 1020

aggtcattcc caactggtga gtatgatgcc accggatcgg ctccaacacc accagttatg 1080

gagccaccgg cgggttcaga agcatccggc actatgagtg ggagtgcacg gacgaacacc 1140

ggctcaaaga gatcaagaac ttccggtggt tggcaacatt tcgatgaggt ggccatgaca 1200

ggccctgatg gaaggcaggt aacattcgcg agatgtagaa tatgcaaaaa taagttatct 1260

gcaaaatcat ctggtggaac aggacatttg aagcggcatg ccgaggcttg tgcaagaag 1320

caaggaatcc aactacgaca gcaacaacta ctactaaatc ctgatggtac ggtacgtacg 1380

tgggagtatg atcctatggt agctcgagaa aatcttgccc gttaattgc tagacaagat 1440

ttacccttga acttttggtga ggtcctgca ttgaaaatt acataaaaaa ttctcataat 1500

cctaggtttc aagctgtag tagacaaacc acaaccgtg atttgaaaaa tgtctatgac 1560

aaaggttatg aatcactgaa ggaattatct agtacatgca ccttttctgt cagtgtcacc 1620

tcagacatat ggagtagtag ggctaaagag gattacctta gtgtagttgt acatttcatt 1680

gatgatgatt ggcaaatgca aaaaagagtt cttggcttaa ggttaattga tgtttcacat 1740

actggtgaaa atatagcaga gagaattcga gaggttattg atgagtttaa ccttgcagat 1800

aaaatttttg ctgtaacaat ggataatgca tctgcaaatt ctagggccat ggaaattcta 1860

caaccattat ttgtatttta tgetcaatca tttcttctgc atcagcgttg tgcatgccat 1920

atcattaatc taattgttaa atgtgggttt aagagagtta atgtacacat cgacgtgtt 1980

cgtcaagcaa tcacgtggtt aactgcttca aaccacgga ttgcacagt gaaaaggat 2040

tgttgtgcat cgggtgagcc cccacgtaag tttttaaccg atgcagacca tcggtggaat 2100

gccacttatt ttatgttaaa ggttgtatta cttacaagg atttacttac tgttttcctt 2160

caaacacgta atggcccaaa aaacagtgat ggccagccaa tactgactga tcataacctgg 2220
cacattgttg aaaggttcaa tcaatttctt gaaacgtttc atgactgtac tcttctgtta 2280
tctcaagtat attatccaac agctaattta attttgcata atattcttga aattgccact 2340
ttgttgaaag agtatgaaaa tgatgacctt ttaatgcccg ttgtctttaa tatgaaacaa 2400
aaatatctta aatattggaa agacatcccc atgttgtatt cttttgcatt tattcttgat 2460
cctaggggaa aattacgggg attcctcaat attctttcac ttattggaga tattattaat 2520
gttgattatt ctacctatta tgctgatgtc aaaactaaat tctatgaggt atttcgaaag 2580
tatgaattaa agtttcaggg agatcgcttg caaagacccc cacctgtacc tgcagcaggt 2640
aagaaaaaat tacagtggag cagaatttgg ggcagttcat cttctagcca tgggtgtggt 2700
accagttcat cagcagcaag tggggacgct agatcgcatg gtcctgccga agagttgtcc 2760
aactatttgg atagcgatgc catcaggcat gaaacgtcag acttcaacgt actcgggtgg 2820
tggaatgac ataagatgtc atatcctgtg ctatcaaaac tagcacggga tgtgttgacg 2880
gtgcccgtat cttcggtatc ctccgaatca gccttcagtc tatgcggaag aattatcgag 2940
gataggagaa caagtctgag cagcgatcat gtggaaatac tattaagcgt caaagactgg 3000
gaacttgctg cagaacatgc ccaatacact gctgacaacc aagaattggc cgcacagttc 3060
gaaaaccttt atttagatga cgaacaatta gggtagctag tttatatttt ttaagtattg 3120
acctgttggc tgtactcttt tctttgtcat ggttttctca aatatgagtt tttacatgat 3180
aaagttttta acgaggcagc atgtatcatg taaacatcaa taaaggtcat tactcttttt 3240
tcctcatatt tttctaatat ttttctaagt ctaattattt ttctattttt ctccaactat 3300
ccattaattt tctcttagct tagttaactt tcagaccttt ctctttgatt tgaattgttc 3360
cactgacaga gtgacagcct gacagtgaca gactgacagg caatagacac acggtgacgg 3420

acagcgtcag caagtccagc gccaccgccg ccacgtgtcg cccttcggcc ggccggtcgc 3480
 gcggccccgg ccgctcgctc ccgctgccg cgttgaaaat ttcagccgcg ccgcgcgcgc 3540
 gccttgctgg cgactcggcg ttgtgccta gccagtcct tcggccgtgc cgcgtgccc 3600
 cgtccctggc tgcagtccgt cgtgccaacg ggctgaccac ggcccatggg ccattgacgt 3660
 gcccggtgccg gcacggcacg gcacgacgtt ccctcgggcc gtgcttgggc cggggagtag 3720
 gcacgtgggc cggcacggca cggcccgtc taggagtcgt gcctaacggg ccgtgcccta 3780
 gcgggcccgtg ccgccggcgt gcccggtccg tgctgggccg ggccgcccgt ttggccaggt 3840
 ata 3843

<210> 8

<211> 3732

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 8

tatacctggc caaatgggcc gtgccaagcc gggccggccc aagcacgacc gcactgtaga 60
 agggccaggc ctggcacagc acgccggcct gtgggccgtg ccggcacggc ccgtttaccc 120
 gtgccgtgtc tgggccgacg ccatagcccg tgggccagca cggcacggca cgtttactgt 180
 agagggttg caccgcatgg cacggcccgc gagcacggca cggcacggga gcggcctagg 240
 gtaggcacac cgcacacgtg gcgccaagcg gccgagccgc cgagggcagc cgcggggcca 300
 ggccggcggga agcgcgcgtc gctgcgttcg cgcgtggcgc gtggcaagcg gcgtcgcgac 360
 gtgtcgctag ggctgggagg ctgggtcgct ctcgctctga ctgcctccgt cactccgtgc 420
 ctcgttggga gcagccgaga cggcgacagg cgactcagcg agaccccata cggcggccga 480
 acagctagtc aaacgacgaa tgcgagagt ccacgtgtcc ccaacggcta gtgagctaata 540
 ccaacgaccg ctgtttttga gaagtagccg ttggagagca aaaaaatgga aaaaaattcg 600

aaaaaaatat gaaatttatt tctataaata ggacacccac cggagcattc tgaatcatct 660
atacctccca ttttgtgctc tgttgtgctc tttcgtgtga tagatcgatt ttttgattta 720
gacaaaattt tgtctaaaat caaaaatagt ttgtgactaa aaatagtga tacaagaggt 780
gtaaaagcaa gcaaagggtg taagaaagaa gtacgtcata tattcagttt tatgtattat 840
tttattttat gttatgcgaa taaatattct gaaatttgtt tatgttgttt taaattttca 900
gaatggacga atcgaacatt ccatcgttca cgtaggtga tttcgaccct aactacgtgt 960
cgaggtcatt cccaactggt gagtatgatg ccaccggatc ggctccaaca ccaccagtta 1020
tggagccacc agcgggttca gaagcatccg gcgctatgag tgggagtga tcgacgaaca 1080
ccggctcaaa gagatcaaga acttccggtg tttggcaaca tttcgatgag gtggccgtga 1140
caggccctga tggaaggcag gtaacattcg cgagatgtag aatatgcaaa aataagttat 1200
ctgcaaaatc atctggtgga ataggacatt tgaagcggca tgccgaggct tgtgcaaaga 1260
agcaaggaat ccaactacga cagcaacaac tactactaaa tcctgatggt acggtacgta 1320
cgtgggagta tgatcctatg gtagctcgag aaaatcttgc ccgtttaatt gctagacaag 1380
atttaccctt gaactttggt gagagtcctg catttgaaaa ttacataaaa aaattctcat 1440
aatcctaggt ttcaagctgt tagtagacaa accacaaccc gtgatttgaa aaatgtctat 1500
gacaaagggt atgaatcact gaaggaatta ttaagtacat gcaccttttc tgtcagtgtc 1560
acctcagaca tatggagtag tagggctaaa gaggattacc ttagtgtagt tgtacatttc 1620
attgatgatg attggcaaat gcaaaaaaga gttcttggct taaggttaat tgatgtttca 1680
cactactggtg aaaatatagc agagagaatt cgagaggtta ttgatgagtt taaccttgca 1740
gataaaattt ttgctgtaac aatggataat gcactcgcaa attctagggc catggaaatt 1800
ctacaacat tattttgtat ttatgctcaa tcatttcttc tgcatcagcg ttgtgcatgc 1860

catatcatta atciaattgt taaatgtggg ttttaagagag ttaatgtaca gatcgacgct 1920
gttcgtcaag caatcacgtg gttactgct tcaaaccac ggattgcaca gtggaaaagg 1980
tattgttggt catcggtga gccccacgt aagtttttaa ccatgcaga ccatcggtgg 2040
aatgccattt attttatgtt aaagggtgta ttaccttaca aggatttact tactgttttc 2100
cttcaaacat gtaatggccc aaaaaacagt gacggccagc caatactgac tgatcatacc 2160
tggcacattg ttgaaagggt caatcaattt cttgaaacgt ttcattgactg tactcttctg 2220
ttatctcaag tatattatcc aacagctaatt ttaattttgc ataattttct tgaaattgcc 2280
actttgtga aagagtatga aaatgatgac cttttaatgc ccgttgtctt taatatgaaa 2340
caaaaatatc ttaaatattg gaaagatatc ctcatgttgt attcttttgc attattctt 2400
gatcctaggg gaaaattacg gggattctc aatattctt cacttattgg agatattatt 2460
aatgttgatt attctaccta ttatgtgat gtcaaaacta aattctatga ggtatttga 2520
aagtatgaat taaagtttca gggagatgc ttgcaaagac cccacactgt ccttgcagca 2580
ggtagaagaa aattacagtg gagcagaatt tggggcggtt catcttctag ccatggtggt 2640
ggtaccagtt catcagcagc aagtggagat gctagatgc atggctctgc cgaagagttg 2700
tccaactatt tggatagcga tgccatcagg catgaaacgt cagacttcaa cgtactcggg 2760
tgggtggaatg atcataagat gtcatacct gtgctatcaa aactagcacg ggatgtgttg 2820
acggtgcccg tatcttcggt atcctccgaa tcagccttca gtctatgcgg aagaattatc 2880
gaggatagga gaacaagtct gagcagcgat catgtggaaa tactattaag cgtcaaagac 2940
tgggaacttg ctgcagaaca tgccaatac actgctgaca accaagaatt ggccgcacag 3000
ttcgaaaacc tttatttaga tgacgaacaa ttagggtagc tagtttatat tttttaagta 3060
ttgacctgtt ggctgtactc tttctttgt catggttttc tcaaatatga gtttttacat 3120

gacaaagttt ttaacgaggc agcatgtatc atgtaaacad caataaaggt cattactctt 3180
 ttttcccat atttttctaa ttttttcta agtctaatta tttttctatt tttctccaac 3240
 tatccattaa ttttctctta gcttagttaa ctttcggacc tttctctttg atttgaattg 3300
 ttccactgac agagtgcagc gcgatagaca cacggacaga ggcaagtcac tgagtcagca 3360
 ttcagcaagt ccagcgccac gtgtcgccct tcggccggcc ggtcccgcgg ccccgccgcg 3420
 tcgctcccgc gtgccgcgtc caaatattca tccgcgcgt cgccttgctg gcgttgctgc 3480
 ctggccagct tgcctgcagt cgatcgtgcc aacgggccga ccacgacca tgggccattg 3540
 acgtgcccgt gcaggcacgg cacggcacga cgttcctcg ggccgtgctt gggccgggga 3600
 gtaggcacgt gggccggcac ggcacggccc gctacaggag tcgtgcctaa cgggcctgc 3660
 cctagcgggc cgtgccgtg gcgtgccgt gccgtgctgg gccgggccgg gccgcccgtt 3720
 tggccaggt ta 3732

<210> 9

<211> 1186

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 9

acactattct ctcttcttct taccaccctc tcccggataa gaggcgaac caaagccccc 60
 accctcgccc aaaaccccca cgagccgcgg ccatggcgac caccaccacc accccctcct 120
 cctctctcac cgccctctc ctccgccga gctcgaacgc gaaccccgcc ccgagatctc 180
 tgccgctcct caggagccgg aggtgcgctc gggccgtggc gaccgcgcgc gccgccgtg 240
 gccacggggc cgctcatcag aggagcggga ttggtcgat cagggatgat ttggtggtgc 300
 cgaggtcgcc ctacttccct gtggagtatg cgtcggggca ggaacgcggg ccatcgccca 360

tggatgatgga gcggttccag agcgtcgtca gccagctctt ccagcacagg attatccggt 420
gtgggtggacc cgtggaggat gatatggcga acatcatcgt tgcccagctg ctatatctcg 480
atgccatcga tectaacaag gatatcatta tgtatgtgaa ttctcctgga ggatcagtga 540
cagctgggat ggccatattc gacacgatga agcatatcag acctgatggt tccacagttt 600
gtattggact tgctgcaagt atgggagctt ttctgcttag tgctgggaca aaaggaagc 660
gatacagctt acctaaactca agaataatga tccatcaacc tctcggagga gccaaggac 720
aagagactga tcttgagatc caggctaag agatgctgca tcacaaggct aacctgaatg 780
gatacctagc ataccacact gggcagcccc tagataagat caacgtagat actgaccgtg 840
attacttcat gagcgcaag gaggcaaagg agtatggtct aattgatgga gttatcatga 900
atccccctaa agcccttcaa ccgcttcctg cttctagtta gccatggagt gctcaatctc 960
cacggagcat tttttggtta tcttttagaa ctgttattgc atccactgtt tttattagct 1020
tggaagata gttttgcgat tccacaagca accacatcct gaggcttcaa agtttgtaca 1080
atacagatgt actactagga ggatatcttc tgcatgaat attgcaactt atttgatgta 1140
ctattaggag gatattctct gcgatgaata ttgcaactta ttgat 1186

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

gataagaggc gcaaccaaag

20

<210> 11

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
tggagccacg acagagtaga 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
gcactggtaa aatcgcctgt 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
aggtggattg cagccttatg 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 14

gaaacgcacc gtttagcaat

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 15

atttgagcac gaggaggaga

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 16

ttatctggga gggtcagac

20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 17

cgatttggtc tttccgtag a

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/11, 5/14, A01H1/00, 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/11, 5/14, A01H1/00, 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database GenBnk accession No. AC 121489, 07 November, 2002 (07.11.02), Wing R.A. et al., Oryza sativa (japonica cultivar-group), chromosome 3, clone OJ1217B09, complete sequence. particularly, gene 69324., 71504	1-10
Y	Database GenBank accession No. AE017111, 06 June, 2003 (06.06.03), Wing R.A. et al., Oryza sativa (japonica cultivar-group), chromosome 10, section 65 of 77 of the complete sequence., particularly, gene 200002., 202182, & Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium, In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10., Science, 06 June, 2003 (06.06.03), 300(5625), p.1566-9	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May, 2004 (19.05.04)

Date of mailing of the international search report

01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003772

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SASAKI T. et al., The genome sequence and structure of rice chromosome 1., Nature, 2002, 420 (6913), p. 312-6 & Database GenBank accession No. AP002818, 29 November, 2002 (29.11.02), SASAKI T. et al., Oryza sativa (japonica cultivar-group), genomic DNA, chromosome 1, PAC clone: P0436E04., particularly, gene 125581..127716 & Database GenBank accession No. AP002863, 29 November, 2002 (29.11.02), SASAKI T. et al., Oryza sativa (japonica cultivar-group), genomic DNA, chromosome 1, PAC clone: P0005A05., particularly, gene 35749..37884 & Database GenBank accession No. AP002899, 29 November, 2002 (29.11.02), SASAKI T. et al., Oryza sativa (japonica cultivar-group), genomic DNA, chromosome 1, PAC clone: P0456A01., particularly, gene 68653..70789 & Database GenBank accession No. AP003142, 29 November, 2002 (29.11.02), SASAKI T. et al., Oryza sativa (japonica cultivar-group), genomic DNA, chromosome 1, PAC clone: P0435H01., particularly, gene 11189..13325	1-10
Y	WO 03/040363 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 15 May, 2003 (15.05.03), Particularly, Claims 1 to 19; page 2, line 9 to page 5, line 10 (Family: none)	1-10
A	Masahiko MAEKAWA et al., "Ine no En'ei Kozatsu yori Shojita Yoryokuso Ijo Hen'itai Kotai ni Shozuru Fukki Hen'i ni tsuite", Breeding Science 1996, Vol.46, separate volume No.2, page 107	1-10
A	MAEKAWA M. et al., Instability of rice chlorophyll mutants induced at M1 by carbon ion beam irradiation is inherited Japan Atomic Energy Research Institute JAERI-Review, 2002, 2002-035, pages 64 to 67	1-10
A	Han CG. et al., New transposable elements identified as insertions in rice transposon Tnrl.Genes.Genet.Syst., 2000, 75(2), pages 69 to 77	1-10
A	Scortecci KC. et al., Somatic excision of the Ac transposable element in transgenic Arabidopsis thaliana after 5-azacytidine treatment. Plant. Cell. Physiol., 1997, 38(3), p.336-43	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003772

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	MAEKAWA M. et al., Induction of variegation in rice chlorophyll Mutants at M1 by carbon ion beam irradiation., Japan Atomic Energy Research Institute JAERI-Review, 2003, November, 2003-033. pages 75 to 77	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N15/11, 5/14, A01H1/00, 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N15/11, 5/14, A01H1/00, 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Database GenBank accession No. AC121489, November 07, 2002, Wing R. A. et al., Oryza sativa (japonica cultivar-group) chromosome 3 clone OJ1217B09, complete sequence. 特に、gene 69324..71504参照。	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
19. 05. 2004

国際調査報告の発送日
01. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
上條 肇

4 B 3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Database GenBank accession No. AE017111, June 06, 2003, Wing R. A. et al., <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) chromosome 10, section 65 of 77 of the complete sequence. 特に、gene 200002..202182参照。 & Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium, In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. Science, 2003 Jun 6, 300(5625), p. 1566-9	1-10
Y	Sasaki T. et al., The genome sequence and structure of rice chromosome 1. Nature, 2002, 420(6913), p. 312-6 & Database GenBank accession No. AP002818, November 29, 2002, Sasaki T. et al., <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, PAC clone:P0436E04. 特に、gene 125581..127716参照。 & Database GenBank accession No. AP002863, November 29, 2002, Sasaki T. et al., <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, PAC clone:P0005A05. 特に、gene 35749..37884参照。 & Database GenBank accession No. AP002899, November 29, 2002, Sasaki T. et al., <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, PAC clone:P0456A01. 特に、gene 68653..70789参照。 & Database GenBank accession No. AP003142, November 29, 2002, Sasaki T. et al., <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, PAC clone:P0435H01. 特に、gene 11189..13325参照。	1-10
Y	WO 03/040363 A1 (科学技術振興事業団) 2003. 05. 15 特に、請求の範囲1-19, 第2頁第9行ー第5頁第10行参照。 (ファミリーなし)	1-10
A	前川雅彦, 他3名, イネの遠縁交雑より生じた葉緑素異常変異体後代 に生ずる復帰変異について 育種学雑誌, 1996, 第46巻, 別冊2号, p. 107	1-10
A	MAEKAWA M. et al., Instability of rice chlorophyll mutants induced at M1 by carbon ion beam irradiation is inherited. 日本原子力研究所JAERI-Review, 2002, 2002-035, p. 64-67	1-10
A	Han CG. et al., New transposable elements identified as insertions in rice transposon Tnrl. Genes Genet. Syst., 2000, 75(2), p. 69-77	1-10

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Scortecci KC. et al., Somatic excision of the Ac transposable element in transgenic Arabidopsis thaliana after 5-azacytidine treatment. Plant Cell Physiol., 1997, 38(3), p. 336-43	1-10
PA	MAEKAWA M. et al., Induction of variegation in rice chlorophyll Mutants at M1 by carbon ion beam irradiation. 日本原子力研究所JAERI-Review, 2003 November, 2003-033, p. 75-77	1-10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.